

1762573
05/00

C p i à l'intention de l'office dés (DO/US)

PCT/FR00/01559

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année)
26 mars 2001 (26.03.01)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340919/18257

Demande internationale no
PCT/FR00/01559

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

RECEIVED

MAY 16 2001

TECH CENTER 1600/2900

NOTIFICATION IMPORTANTE

Date du dépôt international (jour/mois/année)
07 juin 2000 (07.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

le déposant l'inventeur le mandataire le représentant commun

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone
01 45 00 92 02
no de télécopieur
01 45 00 46 12
no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

la personne le nom l'adresse la nationalité le domicile

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone
01 44 29 35 00
no de télécopieur
01 44 29 35 99
no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

à l'office récepteur aux offices désignés concernés
 à l'administration chargée de la recherche internationale aux offices élus concernés
 à l'administration chargée de l'examen préliminaire international autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Fiona DOHERTY

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE REVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340919/18257 | POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER | |
| Demande internationale n° PCT/FR 00/01559 | Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 07/06/2000 | (Date de priorité (la plus ancienne) (<i>jour/mois/année</i>)) 08/06/1999 |
| Déposant TRANSGENE S.A. | | |

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).
3. **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins à publier** avec l'abrégé est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01559

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/19 A61K48/00 A61K38/19 A61K38/20 A61K38/21
 //((A61K38/20,A61K38:19),(A61K38/21,A61K38:19))

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X | WO 94 13321 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 23 juin 1994 (1994-06-23) page 6, ligne 2 – ligne 6 page 7, ligne 13 –page 8, ligne 9 page 30, ligne 19 –page 31, ligne 3 page 34, ligne 1 – ligne 34 page 35 –page 36; tableau 2 ---- | 1-4, 10-19,22 |
| X | WO 97 15595 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;PELUS LOUIS MARTIN (US); KING ANDREW GARR) 1 mai 1997 (1997-05-01) page 2, ligne 13 – ligne 23 page 8, ligne 11 –page 13, ligne 20 ---- | 1-4, 11-19,22 -/- |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01559

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | DILLOO ET AL: "COMBINED CHEMOKINE AND CYTOKINE GENE TRANSFER ENHANCES ANTITUMOR IMMUNITY" NATURE MEDICINE, vol. 2, 1996, pages 1090-1095, XP002133387 cité dans la demande page 1090 abrégé ---- | |
| A | DATABASE MEDLINE 'en ligne! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; LU Y ET AL: "Macrophage inflammatory protein -1alpha (MIP -1alpha) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1." retrieved from STN Database accession no. 1999132267 XP002133388 abrégé & CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (1999 FEB) 115 (2) 335-41., ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01559

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|--|------------------|
| WO 9413321 | A 23-06-1994 | US 6143289 A | | 07-11-2000 |
| | | AU 5847794 A | | 04-07-1994 |
| | | EP 0673256 A | | 27-09-1995 |
| WO 9715595 | A 01-05-1997 | AU 712235 B | | 04-11-1999 |
| | | AU 7520996 A | | 15-05-1997 |
| | | BR 9611173 A | | 30-03-1999 |
| | | CZ 9801202 A | | 16-09-1998 |
| | | EP 0866806 A | | 30-09-1998 |
| | | HU 9802531 A | | 01-02-1999 |
| | | JP 11512747 T | | 02-11-1999 |
| | | NO 981818 A | | 17-06-1998 |
| | | PL 326364 A | | 14-09-1998 |

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

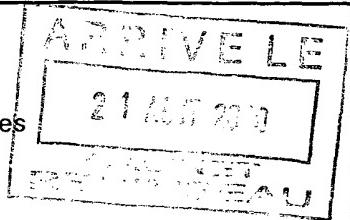
PTO/PCT Rec'd 08 FEB 2001
NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
 Cabinet Regimbeau
 26, avenue Kléber
 F-75116 Paris
 FRANCE



| | |
|---|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 14 août 2000 (14.08.00) | NOTIFICATION IMPORTANTE |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340919/18257 | Demande internationale no PCT/FR00/01559 |

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

TRANSGENE S.A. (pour tous les Etats désignés sauf US)
 REGULIER, Etienne etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 07 juin 2000 (07.06.00)
 Date(s) de priorité revendiquée(s) : 08 juin 1999 (08.06.99)
 Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international : 14 juillet 2000 (14.07.00)

Liste des offices désignés :

(EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
 National :AU,CA,JP,US

ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

| | |
|--|---|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse | Fonctionnaire autorisé Fiona D'OHERTY n° de téléphone (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter dela date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19e mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. Il appartient au déposant de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation , il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

**NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE**

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

| | | | |
|--|---|---|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 14 août 2000 (14.08.00) | | | |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340919/18257 | NOTIFICATION IMPORTANTE | | |
| Demande internationale no PCT/FR00/01559 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juin 2000 (07.06.00) | Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée | Date de priorité (jour/mois/année) 08 juin 1999 (08.06.99) |
| <p>Déposant TRANSGENE S.A. etc</p> <p>1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).</p> <p>2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.</p> <p>3. Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.</p> <p>4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.</p> | | | |
| <u>Date de priorité</u> 08 juin 1999 (08.06.99) | <u>Demande de priorité n°</u> 99/07181 | <u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u> FR | <u>Date de réception du document de priorité</u> 14 juil 2000 (14.07.00) |

| | |
|---|--|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé: Fiona DOHERTY no de téléphone (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réserve à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (*facultatif*)
(12 caractères au maximum) 340919/18257

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION COMPOSITION DESTINEE A LA MISE EN OEUVRE D'UN TRAITEMENT CYTOTOXIQUE, NOTAMMENT ANTITUMORAL OU ANTIVIRAL, CHEZ UN MAMMIFERE

Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

TRANSGENE S.A.
11 Rue de Molsheim
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) : FR

Domicile (nom de l'Etat) : FR

Cette personne est tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

REGULIER Etienne
197 Avenue de Colmar
67100 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

déposant seulement

déposant et inventeur

inventeur seulement
(Si cette case est cochée,
ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FR

Domicile (nom de l'Etat) : FR

Cette personne est tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou mandataire représentant commun des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis,
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric
CABINET REGIMBEAU
26 Avenue Kléber
75116 PARIS
FRANCE

n° de téléphone
01 45 00 92 02

n° de télécopieur
01 45 00 46 12

n° de téléimprimeur

Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

ERBS Philippe
les Malteries
3 Rue Kirschleger
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement*(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)*Nationalité (nom de l'Etat) :
FRDomicile (nom de l'Etat) :
FRCette personne est déposant pour : tous les États désignés tous les États sauf les États-Unis d'Amérique les États-Unis d'Amérique seulement les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement*(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)*

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : tous les États désignés tous les États sauf les États-Unis d'Amérique les États-Unis d'Amérique seulement les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement*(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)*

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : tous les États désignés tous les États sauf les États-Unis d'Amérique les États-Unis d'Amérique seulement les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement*(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)*

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : tous les États désignés tous les États sauf les États-Unis d'Amérique les États-Unis d'Amérique seulement les États indiqués dans le cadre supplémentaire D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

Brevet régional

- AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ République-Unie de Tanzanie, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Biélorussie, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE Emirats arabes unis | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanie | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie | <input type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input type="checkbox"/> MA Maroc |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil | <input type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input type="checkbox"/> BY Biélorussie | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input type="checkbox"/> CN Chine | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark | <input type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input type="checkbox"/> DM Dominique | <input type="checkbox"/> SE Suède |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie | <input type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne | <input type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie | <input type="checkbox"/> TZ République-Unie de Tanzanie |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie | <input type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input type="checkbox"/> IN Inde | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input type="checkbox"/> IS Islande | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- DZ Algérie MZ Mozambique
 AG Antigua et Barbuda

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (La confirmation (y compris les taxes) doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

| Cadre n° VI REVENDICATION DE PRÉORITÉ | | D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire. | | |
|--|---------------------------------|--|---|--|
| Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année) | Numéro de la demande antérieure | Lorsque la demande antérieure est une : | | |
| | | demande nationale : pays | demande régionale :* office régional | demande internationale : office récepteur |
| (1) 08/06/99 | 99 07181 | FRANCE | | |
| (2) | | | | |
| (3) | | | | |

L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) :

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

| | | | |
|--|--|--------|---------------------------|
| Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / EP | Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : | | |
| | Date (jour/mois/année) | Numéro | Pays (ou office régional) |
| | 17 MARS 2000 | OEB | FA 572749 |

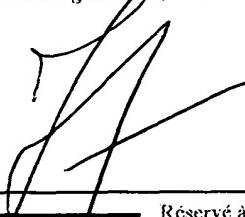
Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT

| | |
|---|--|
| La présente demande internationale contient le nombre de feuillets suivant : | Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : |
| requête : 4 | 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes |
| description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 29 | 2. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé |
| revendications : 4 | 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : |
| abrégé : 1 | 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature |
| dessins : 7 | 5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : |
| partie de la description réservée au listage des séquences | 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : |
| Nombre total de feuillets : 45 | 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés |
| | 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur |
| | 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Copie du Rapport de Recherche |

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé : Langue de dépôt de la demande internationale : Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE

À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

| | | |
|-----------------|---|---|
| WARCOIN Jacques |  | CABINET RECIMBEAU CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE 26, Avenue Kieber 75116 PARIS FRANCE |
|-----------------|---|---|

Réserve à l'office récepteur

| | |
|---|---|
| 1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : | 2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus ; <input type="checkbox"/> non reçus ; |
| 3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale : | |
| 4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT : | |
| 5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA / | 6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche. |

Réserve au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/74629 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/19,
A61K 48/00, 38/19, 38/20, 38/21 // (A61K 38/20, 38:19)
(A61K 38/21, 38:19)

F-67100 Strasbourg (FR). ERBS, Philippe [FR/FR]; Les
Malteries, 3, rue Kirschleger, F-67000 Strasbourg (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01559

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 7 juin 2000 (07.06.2000)

(81) États désignés (*national*): AU, CA, JP, US.

(25) Langue de dépôt: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(26) Langue de publication: français

Publiée:

— *Avec rapport de recherche internationale.*

(30) Données relatives à la priorité:
99/07181 8 juin 1999 (08.06.1999) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): TRANS-
GENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Stras-
bourg (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 22 mars 2001

(72) Inventeurs; et

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): REG-
ULIER, Etienne [FR/FR]; 197, avenue de Colmar,



(54) Title: COMPOSITION FOR IMPLEMENTING A CYTOTOXIC, IN PARTICULAR AN ANTITUMORAL OR ANTIVIRAL,
TREATMENT IN A MAMMAL

A3 (54) Titre: COMPOSITION DESTINEE A LA MISE EN OEUVRE D'UN TRAITEMENT CYTOTOXIQUE, NOTAMMENT
ANTITUMORAL OU ANTIVIRAL, CHEZ UN MAMMIFERE

WO 00/74629

(57) Abstract: The invention concerns a composition for implementing a cytotoxic treatment in a mammal comprising: (i) a nucleic acid sequence coding for all or part of an MIP chemokine; (ii) at least a nucleic acid sequence coding for all or part of a polypeptide having at least a cytotoxic activity, said nucleic acid sequences being placed under the control of elements required for their expression in said mammal's host cell.

(57) Abrégé: La présente invention concerne une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère comprenant: (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP, (ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique; lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

14 December 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) International publication number

WO 00/74629 A2

| | | |
|---|--|--|
| (51) International patent classification ⁷ : | A61K | (74) Representative: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). |
| (21) International application number: | PCT/FR00/01559 | |
| (22) International filing date: | 7 June 2000 (07.06.2000) | |
| (25) Language of filing: | French | (81) Designated states (national): AU, CA, JP, US. |
| (26) Language of publication: | French | (84) Designated states (regional): European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (30) Data relating to the priority: | 99/07,181 8 June 1999 (08.06.1999) | FR |
| (71) Applicant (for all designated States except US): | TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). | |
| (72) Inventors; and | | Published |
| (75) Inventors/Applicants (US only): | REGULIER, Etienne [FR/FR]; 197, avenue de Colmar, F-67100 Strasbourg (FR). ERBS, Philippe [FR/FR]; Les Malteries, 3, rue Kirschleger, F-67000 Strasbourg (FR). | - Without the International Search Report and to be republished once the report has been received. |

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

As printed

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPLEMENTING A CYTOTOXIC, IN PARTICULAR AN ANTITUMORAL OR ANTIVIRAL, TREATMENT IN A MAMMAL

A2 (54) Titre: COMPOSITION DESTINEE A LA MISE EN OEUVRE D'UN TRAITEMENT CYTOTOXIQUE, NOTAMMENT ANTITUMORAL OU ANTIVIRAL, CHEZ UN MAMMIFERE

WO 00/74629 (57) Abstract: The invention concerns a composition for implementing a cytotoxic treatment in a mammal comprising: (i) a nucleic acid sequence coding for all or part of an MIP chemokine; (ii) at least one nucleic acid sequence coding for all or part of a polypeptide having at least a cytotoxic activity, said nucleic acid sequences being placed under the control of elements required for their expression in said mammal's host cell.

(57) Abrégé: La présente invention concerne une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère comprenant: (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP, (ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique; lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle

PTO/PCT REC'D 08 FEB 2001
Bureau international.



(43) Date de la publication internationale
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/74629 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: **A61K**

F-67100 Strasbourg (FR). ERBS, Philippe [FR/FR]; Les Malteries, 3, rue Kirschleger, F-67000 Strasbourg (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01559

(74) Mandataires: **MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).**

(22) Date de dépôt international: 7 juin 2000 (07.06.2000)

(81) États désignés (*national*): AU, CA, JP, US.

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPLEMENTING A CYTOTOXIC, IN PARTICULAR AN ANTITUMORAL OR ANTIVIRAL, TREATMENT IN A MAMMAL

A2 (54) Titre: COMPOSITION DESTINEE A LA MISE EN OEUVRE D'UN TRAITEMENT CYTOTOXIQUE, NOTAMMENT ANTITUMORAL OU ANTIVIRAL, CHEZ UN MAMMIFERE

(57) Abstract: The invention concerns a composition for implementing a cytotoxic treatment in a mammal comprising: (i) a nucleic acid sequence coding for all or part of an MIP chemokine; (ii) at least a nucleic acid sequence coding for all or part of a polypeptide having at least a cytotoxic activity, said nucleic acid sequences being placed under the control of elements required for their expression in said mammal's host cell.

(57) Abrégé: La présente invention concerne une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère comprenant: (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP, (ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptid ayant au moins une activité cytotoxique; lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

WO 00/74629

**Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement
cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, chez un mammifère**

La présente invention concerne une composition cytotoxique 5 comprenant une première séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP et une seconde séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique, notamment antitumorale ou antivirale. La présente invention est particulièrement utile dans le cadre de la mise en oeuvre d'un traitement par 10 thérapie génique de maladies prolifératives ou infectieuses.

A ce jour, les résultats les plus encourageants obtenus dans le cadre de traitements antitumoraux concernent des traitements combinés associant un traitement à base de composés chimiques (chimiothérapie) et un traitement reposant sur l'utilisation de rayonnements (radiothérapie). Outre les 15 désagréments importants qu'occasionne chez le patient ce type de traitement, on constate dans un grand nombre de cas que des cellules tumorales, de type métastatique ou non, persistent chez le sujet traité, pouvant occasionner un rechute et ne permettant donc pas de rémission complète.

De récents travaux conduits dans le domaine du cancer ont proposé 20 d'adapter les protocoles de thérapie génique à la thérapie antitumorale. A cet égard, on peut par exemple citer les travaux de Meneguzzi et al., 1991, Virology, 181, 61-69 relatifs à l'immunisation contre des cellules tumorales à l'aide d'un vecteur recombinant de la vaccine exprimant les gènes E6 et E7 du 25 virus du papillome humain de type 16. On peut également citer le contenu du brevet français FR 92/03120 relatif à l'utilisation d'un adénovirus recombinant exprimant une cytokine dans le cadre d'une thérapie génique antitumorale.

Les cytokines sont des molécules naturellement produites à la suite 30 d'une stimulation antigénique ou d'une réaction inflammatoire (Gillis and Williams, 1998, Curr. Opin. Immunol., 10, 501-503) dont l'utilité dans le cadre du traitement de certains cancers a été montrée notamment par Oettger

(Curr. Opin. Immunol., 1991, 3, 699-705). Ainsi , Leroy et al. (1998, Res.Immunol. 149 (7-8) : 681-684) ont montré que la production de cytokines sur les sites de la tumeur après administration intra-tumorale de vecteurs viraux recombinants permet l'induction d'une réponse immunitaire associée à une inhibition de la croissance tumorale. Néanmoins, cette réponse antitumorale bien qu'encourageante ne permet pas la disparition définitive des cellules tumorales, et par conséquent la mise en œuvre d'un traitement antitumoral satisfaisant.

Les chimiokines constituent pour leur part une sous classe de la famille des cytokines. Elles se distinguent des autres cytokines par leur propriété chimio-attractrice, notamment lors des processus naturels de chimiotactisme, et notamment d'attraction des cellules du système immunitaire vers les tissus dans lesquels siège l'inflammation ou l'infection, ainsi que par leurs propriétés anti-angiogéniques.

Les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire (entre 8 et 10 kd), de petite taille (de 70 à 80 acides aminés) dont les séquences en acides aminés présentent un faible taux d'homologie (variant de 10 à 70 % selon les chimiokines considérées) permettant de définir à ce jour environ 50 chimiokines différentes. Ces chimiokines peuvent néanmoins être subdivisées en 4 grandes familles relatives à la position des résidus cystéines qu'elles renferment. Les familles α dont l'extrémité N-terminale comprend 2 cystéines séparées par un acide aminé unique (chimiokines de type IL-8, NAP-2, GCP-2) et β dont l'extrémité N-terminale comprend 2 cystéines adjacentes (chimiokines de type RANTES, MIP1, MCP1) sont les mieux caractérisées (Horuk, R., 1994, Trends Pharmacol. Sci., 15, pages 159-165 ; Murphy, P.M., 1994, Annu. Rev. Immunol., 12, pages 593-633).

Par ailleurs, le groupe de Dilloo et al. (1996, Nature Medicine, vol. 2, Number 10, 1090-1095) a montré que la co-expression, après administration recombinants chez la souris de fibroblastes modifiés *ex vivo* à l'aide de vecteurs rétroviraux, d'une chimiokine particulière, la lymphotactine (Lptn), et de l'interleukine-2 (IL2), permet de stimuler la réponse immune antitumorale de l'animal traité. Toutefois, cet effet est limité dans le temps, et ne permet

qu'un contrôle transitoire du volume tumoral et aucune rémission chez les animaux traités.

Il est donc souhaitable de disposer de nouvelles compositions permettant notamment la mise en œuvre de traitements antitumoraux efficaces, aisés à mettre en place, c'est à dire permettant un contrôle prolongé du volume tumoral et l'augmentation du taux de survie des patients traités.

Nous avons maintenant identifié de nouvelles compositions cytotoxiques dont les différents constituants sont choisis de façon à obtenir un effet synergique de leurs activités respectives et des propriétés améliorées desdits 10 constituants. Plus particulièrement, de telles compositions permettent d'inhiber ou de retarder la prolifération cellulaire en induisant la mort spécifique des cellules, notamment tumorales, une meilleure présentation des antigènes et/ou une stimulation des cellules immunes de l'organisme hôte. La 15 présente invention offre une alternative avantageuse et efficace aux techniques de l'art antérieur, notamment pour traiter le cancer de l'homme ou de l'animal.

L'invention concerne en premier lieu une composition destinée à la mise en œuvre d'un traitement cytotoxique, par exemple antitumoral ou antiviral, ou toute applications nécessitant la mort cellulaire, chez un mammifère comprenant :

20 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des 25 éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

Dans le cadre de la présente invention, il est possible d'utiliser en (i) l'intégralité de la séquence d'acide nucléique codant pour la chimiokine MIP (pour Macrophage Inflammatory Protein, en anglais) ou une partie seulement 30 de ce polypeptide, ou un polypeptide dérivé ou muté, dans la mesure où la fonction et les propriétés de la chimiokine MIP sont conservées. Au sens de la

présente invention, on entend par mutation, une délétion et / ou une substitution et / ou une addition d'un ou plusieurs nucléotides. De même, il est envisageable d'utiliser une séquence codant pour une chimiokine hybride provenant de la fusion de la séquences codant pour une chimiokine de type 5 MIP et de la séquence codant pour au moins une chimiokine d'un autre type (RANTES, MCP 1, ...).

Dans le cadre de la présente invention, la chimiokine MIP préférée est la chimiokine de type MIP 1, et plus particulièrement sélectionnée parmi le groupe consistant en les chimiokines MIP 1α et MIP 1β dont les propriétés ont 10 été mises en évidence par Wolpe et al, 1988, J. Exp. Med, 167, 570-581.

MIP 1α , dont les séquences en acides nucléiques et peptidique sont décrites dans Obaru et al. 1986, J. Biochem. 99, 885-894, dont le contenu est incorporé par référence dans la présente demande, est produite par les lymphocytes T et les monocytes. Elle permet la chimio-attraction des 15 éosinophiles et des lymphocytes T au cours des infections des voies respiratoires ; des monocytes et des neutrophiles au cours d'arthrites rhumatoïdales, d'inflammations du système digestif ou de méningites d'origine bactérienne. En outre, elle inhibe la prolifération des précurseurs hématopoïétiques.

20 MIP 1β , dont les séquences en acides nucléiques et peptidique sont décrites dans Brown et al. 1989, J. Immunol. 142, 679-68, dont le contenu est incorporé par référence dans la présente demande, est également produite par les lymphocytes T et les monocytes. Elle exerce ses propriétés chimio-attractives sur les monocytes et les neutrophiles dans les cas arthrites 25 osseuses et les méningites bactériennes. Comme MIP 1α , elle inhibe la prolifération des précurseurs hématopoïétiques.

Il existe des variants naturels desdites protéines MIP 1α et MIP 1β qui sont connus de l'homme de l'art et qui portent par exemple les noms GOS19, LD78, pAT464 , TY5 (de souris) ou SIS α (de souris) pour MIP 1α ou pAT744, 30 Act-2, G-26, H-400 (de souris) ou hSIS γ (de souris) pour MIP 1β . Dans le cas particulier de MIP 1β , on choisira par exemple la séquence correspondant à

Act-2 (Lipes et al., 1988, PNAS, 85, 9704-9708, dont le contenu est incorporé ici en référence).

Par « polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique », on entend désigner toute substance peptidique susceptible d'induire ou d'activer une réponse immune dirigée spécifiquement contre une cellule tumorale (l'activité cytotoxique est alors appelée activité antitumorale) ou une cellule infectée par un virus (l'activité cytotoxique est alors appelée activité antivirale) ou d'inhiber la croissance et / ou la division d'une telle cellule, notamment tumorale ou infectée. Selon un cas préféré, ladite activité cytotoxique se traduit par la mort de ladite cellule. Selon un cas particulier, il serait également possible d'utiliser des compositions selon la présente invention dans des cas pathologiques associés à une prolifération cellulaire, telle que par exemple les phénomènes de restenose.

L'activité de chimio-attraction d'un polypeptide donné, notamment dérivé de la chimiokine MIP, sur des cellules impliquées dans les réactions immunes (telles que par exemple des eosinophiles, des lymphocytes T, des monocytes ou des neutrophiles peut être évaluée par un test de chimiotactisme (Maghazachi, 1993, Nature Immunity, 12, 57). De même, ce type de chimiokine inhibant la prolifération des précurseurs hématopoïétiques, il est possible d'évaluer une telle propriété *in vitro* selon Graham et al., 1992, Growth Factors, 7, 151.

L'activité cytotoxique d'un polypeptide donné, notamment une activité antitumorale, peut être évaluée *in vitro* par la mesure de la survie cellulaire soit par des tests de viabilité à court terme (tel que par exemple le test au bleu tryptan ou MTT), soit par des tests de survie clonogénique (formation de colonies) (Brown et Wouters, 1999, Cancer Research, 59, 1391-1399) ou *in vivo* par la mesure de la croissance des tumeurs (taille et/ou volume) dans un modèle animal (Ovejera et Houchens, 1981, Semin. Oncol., 8, 386-393).

Selon une première variante, l'invention concerne une composition caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est choisi parmi les cytokines, les protéines codées par un gène appelé « gène suicide » et les facteurs protéiques antiangiogéniques.

Plus particulièrement, lorsque ledit polypeptide en (ii) est une cytokine, il s'agit préférentiellement d'une cytokine choisie parmi les interférons α , β et γ , les interleukines, et notamment l'IL-2, l'IL-4 l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, les facteurs nécrosant des tumeurs (TNF) et les facteurs stimulateurs de colonies 5 (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...).

Selon un mode de réalisation préféré, ladite cytokine est sélectionnée parmi l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron gamma (IFN- γ). L'interleukine-2 est notamment responsable de la prolifération des lymphocytes T activés, de la multiplication et de l'activation des cellules du système immunitaire (pour la 10 séquence en acide nucléique voir notamment FR 85 09480). L'IFN- γ active les cellules phagocytaires et accroît l'expression des antigènes de surfaces de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (pour la séquence en acide nucléique voir notamment FR 85 09225). Lesdites séquences en acide nucléique sont incorporées par référence dans la présente demande.

15 Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend en (ii) au moins deux séquences d'acide nucléique codant pour tout ou partie de l'interleukine-2 (IL-2) et tout ou partie de l'interféron gamma (IFN- γ).

20 Selon une seconde variante, l'invention concerne également une telle composition caractérisée en ce que ledit polypeptide en (ii) présente au moins une activité enzymatique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucleoside phosphorylase, l'activité guanine ou uracile ou orotate phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine désaminase.

25 Plusieurs études ont permis d'identifier des polypeptides qui ne sont pas toxiques en tant que tels mais qui présentent des propriétés enzymatiques catalytiques capables de transformer une substance inactive (prédrogue), par exemple un nucléoside ou un analogue de nucléoside, en substance hautement毒ique pour la cellule, par exemple un nucléoside modifié qui peut être incorporé dans les chaînes d'ADN ou d'ARN en élongation, avec pour 30 conséquence, notamment, l'inhibition de la division cellulaire ou des dysfonctionnements cellulaires conduisant à la mort de la cellule renfermant

de tels polypeptides. Les gènes codant pour de tels polypeptides sont dits « gènes suicides ». De nombreux couples gène suicide/prédrogue sont actuellement disponibles. On peut citer plus particulièrement, les couples :

- la thymidine kinase du virus herpès simplex de type 1 (TK HSV-1) et
- 5 l'acyclovir ou le ganciclovir (GCV) (Caruso et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-7028 ; Culver et al., 1992, Science 256, 1550-1552 ; Ram et al., 1997, Nat. Med. 3, 1354-1361) ;
 - le cytochrome p450 de rat et la cyclophosphophamide (Wei et al., 1994, Human Gene Therapy 5, 969-978) ;
- 10 - la purine nucleoside phosphorylase d'*Escherichia coli* (*E. Coli*) et la 6-methylpurine deoxyribonucleoside (Sorscher et al., 1994, Gene Therapy 1, 233-238) ;
 - la guanine phosphoribosyl transférase d'*E. coli* et la 6-thioxanthine (Mzoz et Moolten, 1993, Human Gene Therapy 4, 589-595) et
- 15 - la cytosine désaminase (CDase) et la 5-fluorocytosine (5FC).

Plus particulièrement, la CDase est un enzyme qui intervient dans la voie métabolique des pyrimidines par laquelle la cytosine exogène est transformée par le biais d'une désamination hydrolytique en uracile. Des activités CDases ont été mises en évidence chez les procaryotes et les 20 eucaryotes inférieurs (Jund et Lacroix, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615 ; Beck et al., 1972, J. Bacteriol. 110, 219-228 ; De Haan et al., 1972, Antonie van Leeuwenhoek 38, 257-263 ; Hoeprich et al., 1974, J. Inf. Dis. 130, 112-118 ; Esders et Lynn, 1985, J. Biol. Chem. 260, 3915-3922) mais elles sont absentes chez les mammifères (Koechlin et al., 1966, Biochem Pharmacol. 15, 25 435-446 ; Polak et al., 1976, Chemotherapy 22, 137-153). Les gènes *FCY1* de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et *codA* d'*E. coli* codant respectivement pour la CDase de ces deux organismes sont connus et leurs séquences publiées (EP 402 108 ; Erbs et al., 1997, Curr. Genet. 31, 1-6 ; WO93/01281).

La CDase désamine également un analogue de la cytosine, la 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile (5-FU) qui est un composé hautement cytotoxique notamment lorsqu'il est converti en 5-fluoro-UMP (5-FUMP). Les cellules dépourvues d'activité CDase, en raison soit d'une mutation inactivante du gène codant pour l'enzyme, soit de leur déficience naturelle pour cette enzyme (par exemple les cellules mammifères) sont résistantes au 5-FC (Jund et Lacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615 ; Kilstrup et al., 1989, J. Bacteriol. 1989 171, 2124-2127). Par contre, il a été montré qu'il est possible de transmettre la sensibilité au 5-FC à des cellules mammifères dans lesquelles la séquence codant pour une activité CDase a été transférée (Huber et al., 1993, Cancer Res. 53, 4619-4626 ; Mullen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 33-37 ; WO 93/01281). De plus, dans ce cas, les cellules avoisinantes non transformées deviennent également sensibles au 5-FC (Huber et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8302-8306). Ce phénomène, appelé effet de voisinage (bystander en anglais), est dû à l'excrétion par les cellules exprimant l'activité CDase, de 5-FU qui intoxique les cellules voisines par simple diffusion à travers la membrane cellulaire. Cette propriété de diffusion passive du 5-FU constitue un avantage par rapport au système de référence tk/GCV pour lequel l'effet de voisinage nécessite un contact avec les cellules qui expriment tk (Mesnil et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1831-1835). Cet effet constitue par conséquent un atout supplémentaire de l'utilisation de la CDase dans le cadre de la thérapie génique, notamment anticancéreuse.

Cependant, la sensibilité au 5-FC varie beaucoup selon les lignées cellulaires. Une faible sensibilité est observée par exemple dans des lignées tumorales humaines PANC-1 (carcinome de pancréas) et SK-BR-3 (adénocarcinome du sein) transduites par un rétrovirus exprimant le gène codA d'*E. Coli* (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175). Ce phénomène indésirable pourrait s'expliquer par l'absence ou la faible conversion endogène du 5-FU formé par l'action enzymatique de la CDase en 5-FUMP cytotoxique. Cette étape, normalement assurée dans les cellules mammifères par l'orotate phosphorybosyl transférase (Peters et al., 1991, Cancer 68, 1903-1909), peut

être absente dans certaines tumeurs et rendre ainsi la thérapie génique, basée sur la CDase, inopérante.

Chez les procaryotes et eucaryotes inférieurs, l'uracile est transformée en UMP par l'action de l'uracile phosphoribosyl transférase (présentant par conséquent une activité UPRTase). Cette enzyme convertit également le 5-FU en 5-FUMP. Ainsi des mutants *fur1* de la levure *S. cerevisiae* sont résistants à de fortes concentrations de 5-FU (10 mM) et de 5-FC (10 mM) car en absence d'activité UPRTase, le 5-FU, provenant de la désamination du 5-FC par la CDase, n'est pas transformé en 5-FUMP cytotoxique (Jund et Lacroix, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615). Les gènes *upp* et *FUR1* codant pour l'UPRTase respectivement d'*E. coli* et de *S. cerevisiae* ont été clonés et séquencés (Andersen et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204, 51-56 ; Kern et al., 1990, Gene 88, 149-157).

Au sens de la présente invention, un polypeptide ayant une activité UPRTase désigne un polypeptide capable de convertir l'uracile ou un de ses dérivés en un analogue monophosphaté et, en particulier la 5-FU en 5-FUMP. Par « mutation », il faut entendre l'addition, la délétion et/ou la substitution d'un ou plusieurs résidus à un endroit quelconque dudit polypeptide.

L'UPRTase native dont il est question dans la présente invention peut être d'une origine quelconque, notamment procaryotique, fongique ou de levure. A titre illustratif, les séquences d'acide nucléique codant pour les UPRTases d'*E. coli* (Anderson et al., 1992, Eur. J. Biochem 204, 51-56), de *Lactococcus lactis* (Martinussen et Hammer, 1994, J. Bacteriol. 176, 6457-6463), de *Mycobacterium bovis* (Kim et al., 1997, Biochem Mol. Biol. Int 41, 1117-1124) et de *Bacillus subtilis* (Martinussen et al., 1995, J. Bacteriol. 177, 271-274) peuvent être utilisées dans le cadre de l'invention. Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une UPRTase de levure et notamment celle codée par le gène *FUR1* de *S. cerevisiae* dont la séquence divulguée dans Kern et al. (1990, Gene 88, 149-157) est introduite ici par référence. A titre indicatif, les séquences des gènes et celles des UPRTases correspondantes peuvent être trouvées dans la littérature et les banques de données spécialisées (SWISSPROT, EMBL, Genbank, Medline...).

Par ailleurs, la demande PCT/FR99/00904 décrit un gène *FUR1* dépourvu de 105 nucléotides en 5' de la partie codante permettant la synthèse d'une UPRTase délétée des 35 premiers résidus en position N-terminale et débutant à la méthionine en position 36 dans la protéine native. Le produit 5 d'expression du gène mutant, désigné *FUR1Δ105*, est capable de complémenter un mutant *fur1* de *S. cerevisiae*. En outre, le mutant tronqué présente une activité UPRTase supérieure à celle de l'enzyme native. Ainsi, selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le polypeptide codé selon l'invention est un mutant de délétion d'une UPRTase native. La délétion 10 est de préférence localisée dans la région N-terminale de l'UPRTase d'origine. Elle peut être totale (concerner l'ensemble des résidus de ladite région N-terminale) ou partielle (concerner un ou plusieurs résidus continus ou non dans la structure primaire). D'une manière générale, un polypeptide est constitué de parties N-terminale, centrale et C-terminale, chacune 15 représentant environ le tiers de la molécule. Par exemple, l'UPRTase de *S. cerevisiae* ayant 251 acides aminés, sa partie N-terminale est constituée des 83 premiers résidus débutant à la méthionine dite initiatrice située en première position de la forme native. Quant à l'UPRTase d'*E. coli*, sa partie N-terminale couvre les positions 1 à 69.

20 En outre, les demandes de brevet WO96/16183 et PCT/FR99/00904 décrivent l'utilisation d'une protéine de fusion codant pour une enzyme à deux domaines ayant les activités CDase et UPRTase et démontrent que le transfert d'un gène hybride *codA::upp* ou *FCY1::FUR1* ou *FCY1::FUR1Δ105* porté par un plasmide d'expression augmente la sensibilité au 5-FC de cellules B16 25 transfectées. Les séquences protéiques et nucléiques décrites dans ces deux demandes sont incorporées dans la description de la présente demande. Selon ce mode de réalisation, le polypeptide est un polypeptide fusionné en phase avec au moins un second polypeptide. Bien que la fusion puisse avoir lieu à un endroit quelconque du premier polypeptide, les extrémités N ou C-terminales sont préférées et notamment l'extrémité N-terminale. Une fusion 30 des activités CDase et UPRTase permet d'améliorer la sensibilité des cellules cibles à la 5-FC et à la 5-FU.

L'homme de l'art est capable de cloner les séquences de CDase ou UPRTase à partir des données publiées, de procéder à d'éventuelles mutations, de tester les activités enzymatiques des formes mutantes dans un système acellulaire ou cellulaire selon la technologie de l'art ou en suivant le protocole 5 indiqué dans la demande PCT/FR99/00904 et de fusionner, notamment en phase, les polypeptides d'activité CDase et UPRTase, et par conséquent tout ou partie des gènes correspondants.

Par conséquent, selon un cas précis, la composition de l'invention est caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique (ii) est sélectionnée parmi 10 les séquences nucléiques des gènes CodA, upp, FUR1; FCY1 et FUR1Δ105, ou par une combinaison de tout ou partie desdites séquences.

L'invention concerne plus particulièrement une dite composition caractérisée en ce que ledit polypeptide en (ii) présente au moins une activité CDase et une activité UPRTase.

15 Par « combinaison de séquences d'acide nucléique » on entend désigner aussi bien des séquences distinctes qui codent pour au moins deux polypeptides distincts que des séquences fusionnées qui codent pour des polypeptides de fusion, étant entendu que la production de tels polypeptides peut être réalisée sous le contrôle des mêmes éléments de régulation (cassette 20 polycistronique) ou d'éléments indépendants, identiques ou différents, homologues ou hétérologues vis à vis du vecteur les renfermant, constitutifs ou inductibles.

Selon un mode particulier de réalisation, la composition de l'invention comprend au moins une séquence d'acide nucléique (ii) codant pour un 25 polypeptide de fusion dans lequel un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase est fusionné en phase avec au moins un second polypeptide, ledit second polypeptide présentant une activité CDase ou UPRTase, respectivement. Plus particulièrement, un tel polypeptide est caractérisé en ce que la fusion avec le second polypeptide est réalisée à 30 l'extrémité N-terminale dudit premier polypeptide.

Selon un cas préféré, ladite composition est caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique codant pour ledit polypeptide de fusion est une séquence hybride comprenant :

- une première séquence d'acide nucléique codant pour un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase,
- une seconde séquence d'acide nucléique codant pour un second polypeptide présentant une activité Cdase ou UPRTase, respectivement.

Une telle séquence d'acide nucléique hybride codant pour ledit polypeptide de fusion peut en outre renfermer une séquence de type IRES.

10 L'invention concerne notamment une telle composition pour laquelle la première séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi upp, FUR1 et FUR1Δ105, et en ce que la seconde séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi CodA et FCY1, et vice-versa. De manière tout à fait préférée, une telle séquence d'acide nucléique hybride est choisie parmi les 15 séquences hybrides décrites dans les demandes de brevet WO96/16183 et PCT/FR99/00904.

20 Selon une troisième variante, la composition selon la présente invention est caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique (ii) est un facteur protéique anti-angiogénique. L'angiogénèse est le processus responsable de la formation de nouveaux capillaires à partir du réseau vasculaire déjà existant. Ce processus complexe est finement régulé dans les tissus sains par la balance des effets de nombreux facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques. Cependant, dans certaines pathologies, et notamment lors de la formation d'une tumeur, ce processus est dérégulé : les facteurs 25 angiogéniques prennent le pas sur les facteurs anti-angiogéniques ce qui permet une vascularisation importante des tumeurs et par voie de conséquence leur développement rapide et / ou l'apparition de métastases. C'est pourquoi, dans le cadre de la présente invention, un facteur anti-angiogénique est considéré comme étant un agent cytotoxique, notamment 30 antitumoral. Parmi les différents facteurs anti-angiogéniques connus à l'heure actuelle on peut notamment citer l'angiotensine, l'endostatine, le facteur

plaquettaire PF4, la thrombospondine-1, le PRP (pour Proliferin Related Protein), le VEGI (pour Vascular Endothelial Growth Inhibitor) les metalloprotéases et l'urokinase.

Les séquences d'acide nucléique (i) ou (ii) peuvent être aisément 5 obtenues par clonage, par PCR ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles en usage. Il peut s'agir de gènes natifs ou dérivés de ces derniers par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides. Par ailleurs, leur séquences sont largement décrites dans la littérature consultable par l'homme de l'art.

La présente invention a également trait à une composition telle que 10 présentée ci-dessus caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans un vecteur recombinant d'origine plasmidique ou virale, ainsi qu'à un tel vecteur recombinant portant de telles 15 séquences nucléotidiques placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte. Les séquences d'acide nucléique (i) et (ii) peuvent être présentes en un ou plusieurs exemplaires sur un même vecteur.

Plus particulièrement, les compositions de l'invention peuvent comprendre lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) insérées dans un même vecteur recombinant ou dans des vecteurs recombinants distincts.

Par « vecteur recombinant » selon l'invention, on entend désigner un 20 « vecteur d'origine plasmidique ou virale, et éventuellement un tel vecteur associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité dudit vecteur et/ou la protection dudit vecteur *in vivo* à l'égard du système immunitaire de l'organisme hôte. Ces substances sont 25 largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman , 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de 30 protéines nucléaires ou virales ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Des exemples de tels composés sont notamment disponibles dans les demandes de brevet WO

98/08489, WO 98/17693, WO 98/34910, WO 98/37916, WO 98/53853, EP 890362 ou WO 99/05183. Une combinaison envisageable est un vecteur recombinant plasmidique associé à des lipides cationiques (DOGS, DC-CHOL, spermine-chol, spermidine-chol etc...) et des lipides neutres (DOPE).

5 Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme de l'art et nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On 10 peut citer à titre d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une 15 origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une cellule productrice et/ou une cellule hôte (par exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de 20 sélectionner ou identifier les cellules transfectées (complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence cer qui favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherratt, 1984, 25 Cell 36, 1097-1103, séquences d'intégration dans le génome cellulaire).

S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager un vecteur dérivant d'un poxvirus (virus de la vaccine, notamment MVA, canaripox... etc), d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un foamyvirus ou d'un virus associé à l'adénovirus. On aura de préférence 30 recours à un vecteur non réplicatif et non intégratif. A cet égard, les vecteurs adénoviraux conviennent tout particulièrement à la mise en oeuvre de la présente invention. Toutefois, il convient de noter ici que dans le cadre de la

mise en oeuvre de la présente invention, la nature du vecteur revêt peu d'importance.

Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application cancer. Un rétrovirus recombinant selon l'invention comporte généralement les séquences LTR, une région d'encapsidation et la séquence nucléotidique selon l'invention placée sous le contrôle du LTR rétroviral ou d'un promoteur interne tels que ceux décrits ci-après. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, feline, humain etc...) et en particulier du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsidation capable de fournir *en trans* les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTR (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation (remplacement par une région d'encapsidation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

On pourra également avoir recours à un vecteur adénoviral défectif pour la réPLICATION c'est à dire dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la réPLICATION sélectionnée parmi les régions E1, E2, E4 et. Une délétion de la région E1 est préférée. Mais elle peut être combinée à d'autres modification(s)/délétion(s) touchant notamment tout ou partie des régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles défectives sont complémentées en trans au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxilliaire afin d'assurer la production des particules virales d'intérêt. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de seconde génération de l'état de la technique (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119). A titre illustratif, la délétion de la majorité de la région E1 et de l'unité de transcription E4 est tout particulièrement avantageuse. Dans le but d'augmenter les capacités de

clonage, le vecteur adénoviral peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon une autre alternative, on peut mettre en oeuvre un vecteur adénoviral minimal retenant les séquences essentielles à l'encapsidation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région 5 d'encapsidation. Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus d'origine humaine ou animale (canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine, simienne...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines 10 différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol., 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera 15 un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C, notamment de type 2 ou 5. Un vecteur adénoviral selon la présente invention peut être généré *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par ligation ou recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale WO96/17070) ou encore par recombinaison dans une lignée de 20 complémentation. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont connus (voir par exemple Graham et Prevec, 1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.).

Les éléments nécessaires à l'expression sont constitués par l'ensemble des 25 éléments permettant la transcription de la séquence nucléotidique en ARN et la traduction de l'ARNm en polypeptide, notamment les séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Ces éléments 30 peuvent être régulables ou constitutifs. Bien entendu, le promoteur est adapté au vecteur retenu et à la cellule hôte. On peut citer, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), α-1

antitrypsine, CFTR, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire, immunoglobuline, β -actine (Tabin et al., 1982, Mol. Cell Biol. 2, 426-436), SR α (Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 466-472), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur de MPSV, le promoteur TK-HSV-1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus), les promoteurs du virus de la vaccine p7.5K pH5R, pK1L, p28, p11 et les promoteurs adénoviraux E1A et MLP ou une combinaison desdits promoteurs. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748), tyrosinose surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et α -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). Le promoteur précoce du Cytomégalovirus (CMV), ou celui du RSV, est tout particulièrement préféré. Il est également possible d'utiliser une région promotrice tissu-spécifique, notamment lorsque la tumeur à traiter est issue d'un type cellulaire particulier, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Les éléments nécessaires peuvent, en outre, inclure des éléments additionnels améliorant l'expression de la séquence nucléotidique selon l'invention ou son maintien dans la cellule hôte. On peut citer notamment les séquences introniques (WO 94/29471), séquences signal de sécrétion, séquences de localisation nucléaire, sites internes de réinitiation de la traduction de type IRES, séquences poly A de terminaison de la transcription.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne plus particulièrement un vecteur recombinant, notamment un vecteur viral, et plus spécifiquement un vecteur adénoviral défectif pour la réplication, comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

5 lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte et étant définies comme indiqué ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une particule virale, notamment adénovirale, comprenant un vecteur viral recombinant selon 10 l'invention. Une telle particule virale peut être générée à partir d'un vecteur viral selon toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art. Sa propagation est effectuée notamment dans une cellule de complémentation adaptée aux déficiences dudit vecteur. S'agissant d'un vecteur adénoviral, on aura par exemple recours à une lignée de complémentation telle que décrite 15 dans la demande WO 94/28152, à la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente efficacement la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72), la lignée A549-E1 (Imler et al., 1996, Gene Therapy 3, 75-84) ou une lignée permettant une double complémentation (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Krougliak et 20 Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586 ; Wang et al., 1995 Gene Therapy 2, 775-783 ; demande internationale WO 97/04119). On peut également employer des virus auxiliaires pour complémenter au moins en partie les fonctions défectives. Par cellule de complémentation, on entend une cellule capable de fournir *en trans* les facteurs précoces et/ou tardifs 25 nécessaires à l'encapsidation du génome viral dans une capsidé virale pour générer une particule virale contenant le vecteur recombinant. Ladite cellule peut ne pas complémenter à elle seule toutes les fonctions défectives du vecteur et dans ce cas peut être transfectée/transduite par un vecteur/virus auxiliaire apportant les fonctions complémentaires.

30 L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale, selon lequel :

- (i) on introduit un vecteur recombinant selon l'invention dans une cellule, notamment une cellule de complémentation capable de complémer *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une dite cellule transfectée,
- 5 (ii) on cultive ladite cellule transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et
- (iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également à partir des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium...).

L'invention a également trait à une cellule hôte eucaryote comprenant les fragments d'ADN présents dans la composition selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine. Il s'agira de préférence d'une cellule 293, LCA4 ou PERC6. Une telle cellule est notamment utile pour produire les particules virales à haut titre, sans générer de particules compétentes pour la réPLICATION . L'invention concerne également une cellule hôte comprenant une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant selon l'invention ou infectée par une particule virale selon l'invention. Aux fins de la présente invention, 25 une cellule hôte est constituée par toute cellule transfectable par un vecteur recombinant ou infectable par une particule virale, tels que définis ci-avant. Une cellule de mammifère et notamment humaine convient tout particulièrement. Elle peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou non (éposome). Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale 30 d'une origine quelconque, notamment hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire

(cellule satellite, myocyte, myoblaste, muscle lisse...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

L'invention concerne également une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral, ou toute applications nécessitant la mort cellulaire, chez un mammifère comprenant :

- (i) tout ou partie du polypeptide MIP,
- (ii) tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

lesdits polypeptides étant définis comme indiqué précédemment.

Un autre objet selon l'invention consiste en une formulation destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, chez un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte une composition (à base d'acides nucléiques ou de polypeptides telle que décrite précédemment), un vecteur adénoviral ou une particule virale selon l'invention, ainsi qu'un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est préférentiellement isotonique, hypotonique ou faiblement hypertonique et présente une force ionique relativement faible, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, un tel support peut renfermer tout solvant, ou liquide aqueux ou partiellement aqueux tel que de l'eau stérile non pyrogène. Le pH de la formulation est en outre ajusté et tamponné afin de répondre aux exigences d'utilisation *in vivo*. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Pour une administration injectable, on préfère une formulation en solution aqueuse, non-aqueuse ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

Selon un mode particulier de l'invention, ladite formulation comporte en outre des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une

prodigue capable d'être transformée en molécule cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique.

Une telle prodigue sera notamment sélectionnée dans le groupe consistant en l'acyclovir ou le ganciclovir (GCV), la cyclophosphophamide, la 5 6-methylpurine deoxyribonucleoside, la 6-thioxanthine, la cytosine ou un de ses dérivés ou l'uracile ou un de ses dérivés. De manière tout à fait préférée, ladite prodigue est la 5-fluorocytosine (5FC) ou la 5-fluorouracile (5-FU).

Par ailleurs, notamment dans le cadre de formulations renfermant une composition selon la seconde variante évoquée ci-dessus, il convient de noter 10 que ladite formulation peut également comprendre une ou plusieurs substances potentialisant l'effet cytotoxique du 5-FU. On peut citer en particulier, les drogues inhibant les enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines (par exemple celles citées ci-après), les drogues telles que la Leucovorin (Waxman et al., 1982, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 685-692) qui 15 en présence du produit du métabolisme du 5-FU (5-FdUMP) augmente l'inhibition de la thymidylate synthase ce qui entraîne une diminution du pool de dTMP nécessaire à la réplication et enfin les drogues telles que le méthotréxate (Cadman et al., 1979, Science 250, 1135-1137) qui en inhibant la dihydrofolate réductase et en élevant le pool d'incorporation de PRPP 20 (phosphoribosylpyrophosphate) provoque l'augmentation de 5-FU dans l'ARN cellulaire.

Une formulation selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique et s'adresse plus particulièrement aux maladies prolifératives (cancers, tumeurs, 25 resténose...etc) et aux maladies d'origine infectieuse, notamment virale pour lesquelles il est nécessaire de limiter la prolifération des cellules infectées (induites par les virus de l'hépatite B ou C, le HIV, l'herpès, les rétrovirus....etc).

Une formulation selon l'invention peut être fabriquée de manière 30 conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut

citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse.

5 L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu, de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. Les préparations à base de particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} usp (unités formant des plages), avantageusement 10^5 et 10^{13} usp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} usp. Pour ce qui est du vecteur recombinant selon l'invention, des doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, 0,5 à 5 mg peuvent être envisagées. Une

10 composition à base de polypeptides comprend de préférence de 0,05 à 10 g et, de manière tout à fait préférée, de 0,5 à 5 g dudit polypeptide. Bien entendu, les doses peuvent être adaptées par le clinicien.

15

La présente invention est également relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition, d'un vecteur recombinant ou d'une particule virale selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique, notamment pour la préparation d'un médicament cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, destiné à inhiber la croissance ou provoquer le rejet d'une tumeur ou la mort d'une cellule infectée. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible ou à sa périphérie, dans les poumons par aérosol, dans le système vasculaire au moyen d'une sonde appropriée...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient. Une utilisation préférée consiste à traiter ou prévenir les cancers, tumeurs et maladies résultant d'une prolifération cellulaire non désirée. Parmi

20

25

30

- les applications envisageables, on peut citer les cancers du sein, de l'utérus (notamment ceux induits par les papillomas virus), de la prostate, du poumon, de la vessie, du foie, du colon, du pancréas, de l'estomac, de l'oesophage, du larynx du système nerveux central et du sang (lymphomes, leucémie etc...).
- 5 Elle est également utile dans le cadre des maladies cardiovasculaires, par exemple pour inhiber ou retarder la prolifération des cellules de muscles lisses de la paroi vasculaire (resténose). Enfin pour ce qui est des maladies infectieuses, l'application au SIDA peut être envisagée.

Il est par ailleurs envisageable, le cas échéant et sans sortir du cadre de la 10 présente invention, de procéder à des administrations simultanées ou successives par des voies différentes des différents composants compris dans la composition ou la formulation pharmaceutique selon l'invention.

L'invention s'étend également à une méthode pour le traitement des maladies par thérapie génique, caractérisée en ce que l'on administre à un 15 organisme ou à une cellule hôte ayant besoin d'un tel traitement une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention.

Lorsque la méthode de traitement met en oeuvre une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant ou une particule virale permettant 20 l'expression d'un polypeptide selon l'invention ayant une activité UPRTase, il peut être avantageux d'administrer en outre une seconde séquence nucléotidique codant pour un second polypeptide présentant une activité CDase, ladite seconde séquence nucléotidique étant portée par ledit vecteur recombinant ou particule virale ou par un vecteur ou une particule virale 25 indépendante. Dans ce dernier cas, l'administration des séquences UPRTase et CDase peut être simultanée ou consécutive, l'ordre d'administration étant sans importance.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'utilisation thérapeutique ou 30 la méthode de traitement comprend également une étape supplémentaire selon laquelle on administre à l'organisme ou la cellule hôte des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une prédrogue,

avantageusement d'un analogue de cytosine et, en particulier de la 5-FC. A titre illustratif, une dose de 50 à 500 mg/kg/jour peut être employée avec une préférence pour 200 mg/kg/jour. Dans le cadre de la présente invention, la prédrogue est administrée selon les pratiques standards et ceci de manière préalable, concomittante ou encore postérieure à celle de l'agent thérapeutique selon l'invention. La voie orale est préférée. On peut administrer une dose unique de prédrogue ou des doses répétées pendant un temps suffisamment long pour permettre la production du métabolite toxique au sein de l'organisme ou de la cellule hôte.

Selon une mode avantageux de l'invention, l'utilisation thérapeutique ou la méthode de traitement est associée à un second traitement du patient par chirurgie (notamment par ablation de la tumeur partiellement ou totalement), par radiothérapie ou chimiothérapie. Dans ce cas particulier, le traitement selon l'invention est appliqué de manière préalable, concomitante ou fait suite audit second traitement. De manière préférée, ce traitement sera appliqué suite audit second traitement.

Les exemples qui suivent ont pour but d'illustrer les différents objets de la présente invention et n'ont par conséquence aucun caractère limitatif.

La figure 1 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2 implantées avec des cellules tumorales B16F0.

La figure 2 représente le taux de survie de ces mêmes souris. Des groupes de 15 souris sont traités à l'aides de compositions comprenant des adénovirus exprimant les gènes suivants : huMIP α , huIL2, huMIP α +huIL2, Ad vide.

La figure 3 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2 implantées avec des cellules tumorales RENCA.

La figure 4 représente le taux de survie de ces mêmes souris. Des groupes de 15 souris sont traités à l'aides de compositions comprenant des adénovirus exprimant les gènes suivants : huMIP β , huIL2, huMIP β +huIL2, Ad vide.

La figure 5 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2 implantées avec des cellules tumorales P815.

La figure 6 représente le taux de survie de ces mêmes souris. Des groupes de 15 souris sont traités à l'aides de compositions comprenant des adénovirus exprimant les gènes suivants : Tampon Tris, huMIP α +huIL2, huMIP1 α + muIFN γ , huIL2 + muIFN γ .

- 5 La figure 7 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2 implantées avec des cellules tumorales RENCA. Ces souris sont traitées à l'aide de compositions comprenant des adénovirus exprimant le gène MIP1 β humain (huMIP1 β) en combinaison avec des adénovirus exprimant le gène murin IL12 (muIL12), ou des adénovirus exprimant le gène muIL12, ou des
10 adénovirus ne contenant aucun transgène (Ad vide).

EXEMPLES :

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées
15 dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de recombinaison homologue sont de préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des
20 sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle
25 que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier.

Modèles tumoraux :

- 30 Trois modèles de cellules tumorales ont été choisis afin d'évaluer l'activité de la composition de l'invention : P815 (mastocytome H-2d, décrite dans Dunn et al, 1957, J.Natl. Cancer Inst., 18, 587-590), B16FO (mélanome

H-2b, décrite dans Wu et al, 1996, Cancer Res., 56, 21-26) et RENCA (carcinome rénal H-2d, décrite dans Murphy et al, 1973, J.Natl.Cancer Inst., 50(4), 1023-1025). Les cellules (3E+5 pour chaque modèle de tumeur) sont implantées à J-7 /J-11 en sous cutané dans le flanc droit de souris B6D2 5 âgées de 6 à 8 semaines.

Administration des compositions cytotoxiques de l'invention :

Un volume de 100 µl de vecteurs adénoviraux (5 x 10⁸ unités infectieuses) est injecté directement dans les tumeurs lorsque leur volume 10 avoisine 4 à 10 mm³ (J0). Cette injection est répétée dans les mêmes conditions à J1 et J2.

L'efficacité de la composition de l'invention administrée est contrôlée par la mesure de la taille des tumeurs ainsi que par la mesure du temps de survie des souris traitées avec le cas échéant un contrôle du statut 15 immunologique de l'animal par ELISPOT, test CTL, ... Les animaux peuvent en outre être ensuite soumis à un challenge contra-latéral au cours duquel une dose létale de cellules tumorales est administrée à l'animal pré-traité.

EXEMPLE 1 :

20 *Construction de pTG13010 (huMIP1α).*

L'ADNc de MIP1α humain (Numéro d'accèsion auprès de GenBank : X03754 ; séquence incorporée à la demande par référence) a été assemblé par oligonucléotides synthétiques suivant la séquence décrite par Obaru,K. & al. 1986, J. Biochem. 99 (3), 885-894. Cet ADNc a été introduit dans un vecteur 25 dérivé de pBluescript pour donner le vecteur pTG13006.

Le fragment *NotI-Asp718* de pTG13006 renfermant le gène MIP1α est isolé et introduit dans le vecteur pTG8347 clivé par ces mêmes enzymes, pour donner le vecteur de transfert pTG13008. A titre indicatif, pTG8347 est un vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) dans lequel sont 30 insérées les séquences Ad5 1 à 458, le promoteur RSV, les séquences d'épissage de l'intron 2 de la bêta-globine 1 de lapin, les séquences de polyadénylation de la bêta-globine 1 de lapin et les séquences Ad5 3328-5788. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art, notamment sur la

base de la demande française 97 06757. Le vecteur adénoviral pTG13010 est reconstitué par recombinaison dans la souche *E. coli* BJ 5183 entre le fragment *PacI-BstEII* de pTG13008 et le vecteur pTG6624 (décrit dans la demande française 97 06757) linéarisé par *Clal*. A titre indicatif, pTG6624 5 correspond au plasmide p poly II portant le génome Ad5 délété des régions E1 (nt 459 à 3327) et E3 (nt 28592 à 30470) la cassette d'expression de MIP étant insérée à la place de E1.

La construction finale pTG13010 contient le génome Ad5 délété de l'essentiel des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt 28249 à 30758) et en lieu 10 et place de E1, une cassette pour l'expression du gène MIP1 α placé sous le contrôle du promoteur RSV et des séquences d'épissage de l'intron 2 de la bêta-globine 1 de lapin. Les particules adénovirales sont générées par transfection dans une lignée de complémentation de la fonction E1, par exemple la lignée 293 (ATCC CRL1573) selon les techniques de l'art (Graham 15 et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology Vol7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ).

Construction de pTG13023 (huMIP1 β / variant Act2).

L'ADNc de MIP1 β humain (Numéro d'accésion GenBank : J04130 ; séquence incorporée à la demande par référence) a été assemblé par 20 oligonucléotides synthétiques suivant la séquence décrite par Lipes,M.A. et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (24), 9704-9708. Cet ADNc a été introduit dans un vecteur dérivé de M13TG130 (KIENY et al. 1983, Gene, 26, 91-99) pour donner le vecteur M13TG13013.

Le fragment *NotI-Asp718* de M13TG13013 renfermant le gène MIP1 β 25 est isolé et introduit dans le vecteur pTG8347 clivé par ces mêmes enzymes, pour donner le vecteur de transfert pTG13015. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art, notamment sur la base de la demande française 97 06757. Le vecteur adénoviral pTG13023 est reconstitué par recombinaison dans la souche *E. coli* BJ 5183 entre le fragment *PacI-BstEII* de pTG13015 et 30 le vecteur pTG6624 (décrit dans la demande française 97 06757) linéarisé par *Clal*.

La construction finale pTG13023 contient le génome Ad5 délété de l'essentiel des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt 28249 à 30758) et en lieu

et place de E1, une cassette pour l'expression du gène MIP1 β placé sous le contrôle du promoteur RSV et des séquences d'épissage de l'intron 2 de la β globine 1 de lapin. Les particules adénovirales sont générées par transfection dans une lignée de complémentation de la fonction E1, par exemple la lignée 5 293 (ATCC CRL1573) selon les techniques de l'art (Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology Vol7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ).

EXEMPLE 2 :

10 Expériences *in vivo*.

Afin d'évaluer la capacité des compositions de l'invention à inhiber la croissance des tumeurs *in vivo*, 3.10^5 cellules B16F0, RENCA ou P815 sont injectées à ($J = -10/-7$) dans des souris immunocompétentes B6D2. Dès que les tumeurs deviennent palpables ($J=0$) différentes compositions (voir la 15 légende des figures 1 à 6) sont injectées à trois reprises ($J0, J1, J2$) par voie intra-tumorale à une dose de 5.10^8 unités infectieuses.

Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation des taux de survie (figures 1, 3 et 5) associée à une baisse des volumes tumoraux (figures 2, 4 et 6) chez les souris traitées avec les compositions comprenant un 20 adénovirus exprimant MIP1 α ou MIP1 β associé à l'IL2 ou l'IFN γ . Ces résultats confirment bien l'intérêt des composition de l'invention dans la mise en œuvre d'un traitement antitumoral.

Les souris ainsi traitées sont ensuite soumises à un challenge contralatéral consistant en une administration dans les conditions décrites 25 précédemment d'une dose létale (3.10^5 cellules) de cellules tumorales à J80/J100. On a ainsi constaté que les résultats décrits ci-dessus sont en outre assortis d'un état immunitaire de la souris tel qu'aucune tumeur n'est capable de se développer après cette étape de challenge.

30 **EXEMPLE 3 :**

Expériences *in vivo*

Afin d'évaluer la capacité des compositions de l'invention à inhiber la croissance des tumeurs *in vivo*, 4.10^5 cellules RENCA sont injectées à ($J = 0$)

dans des souris immunocompétentes B6D2. Dès que les tumeurs deviennent palpables ($J = 6$) différentes compositions renfermant soit 2.10^8 unités infectieuses (ui) d'un adénovirus exprimant le gène MIP1 β humain (huMIP1 β) en combinaison avec 2.10^8 ui d'un adénovirus exprimant le gène murin IL12 (muIL12), soit 2.10^8 ui d'un adénovirus exprimant le gène muIL12 en combinaison avec 2.10^8 ui d'un adénovirus ne renfermant aucun transgène (Ad vide), soit 4.10^8 ui d'un Ad vide, sont injectées à trois reprises (J6, J7, J8) par voie intra-tumorale. Pour toutes ces compositions, les adénovirus sont dans une solution contenant 100 mM de Tris et 10 mM de MgCl₂. Il a été par ailleurs vérifié que les souris traitées dans les mêmes conditions par une composition comprenant seulement les adénovirus exprimant le gène MIP1 β présentaient des tumeurs de volume identique ou même supérieur à celles observées chez des souris traitées par une composition comprenant des Ad vides.

Les résultats obtenus selon cet exemple (figure 7) mettent en évidence une baisse des volumes tumoraux chez les souris traitées avec les compositions de l'invention comprenant un adénovirus exprimant MIP1 β associé à un adénovirus exprimant l'IL12, tout particulièrement par comparaison aux résultats observés lors du traitement des souris avec muIL12 seul. Ces résultats confirment bien l'intérêt des compositions de l'invention dans la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral.

REVENDICATIONS

1. Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère comprenant :

5 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

10 lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite chimiokine MIP est la chimiokine MIP1, et plus particulièrement sélectionnée parmi le groupe consistant en les chimiokines MIP1 α et MIP1 β .

15 3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est choisi parmi les cytokines, les protéines codées par les gènes suicides et les facteurs protéiques anti-angiogéniques.

20 4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est une cytokine choisie parmi les interférons α , β et γ , les interleukines, les facteurs nécrosant des tumeurs et les facteurs stimulateurs de colonies.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est l'interleukine-2 (IL-2).

25 6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est l'interféron gamma (IFN- γ).

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en (ii) au moins deux séquences d'acide nucléique codant

pour tout ou partie de l'interleukine-2 (IL-2) et tout ou partie de l'interféron gamma (IFN- γ).

8. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide présente au moins une activité cytotoxique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucleoside phosphorylase, l'activité guanine phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine désaminase.

9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit polypeptide présente au moins une activité CDase et une activité UPRTase.

10 10. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est un facteur protéique anti-angiogénique choisi parmi l'angiotensine, l'endostatine, le facteur plaquettaire PF4, la thrombospondine-1, le PRP, le VEGI, les métalloprotéases et l'urokinase.

15 11. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans un vecteur recombinant d'origine plasmidique ou virale.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans le même vecteur recombinant.

13. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans des vecteurs recombinants distincts.

14. Vecteur comprenant :

25 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou d'une chimiokine MIP,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte.

15. Vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

5 16. Particule virale comprenant un vecteur selon la revendication 15.

17. Procédé de préparation d'une particule virale selon la revendication 16, selon lequel :

10 (i) on introduit un vecteur viral selon la revendication 15 dans une cellule capable de produire ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule transfectée,

(ii) on cultive ladite cellule transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

15 18. Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère comprenant :

(i) tout ou partie d'un polypeptide MIP,

(ii) tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

20 selon laquelle lesdits polypeptides (i) et (ii) sont tels que définis dans les revendications 1 à 10.

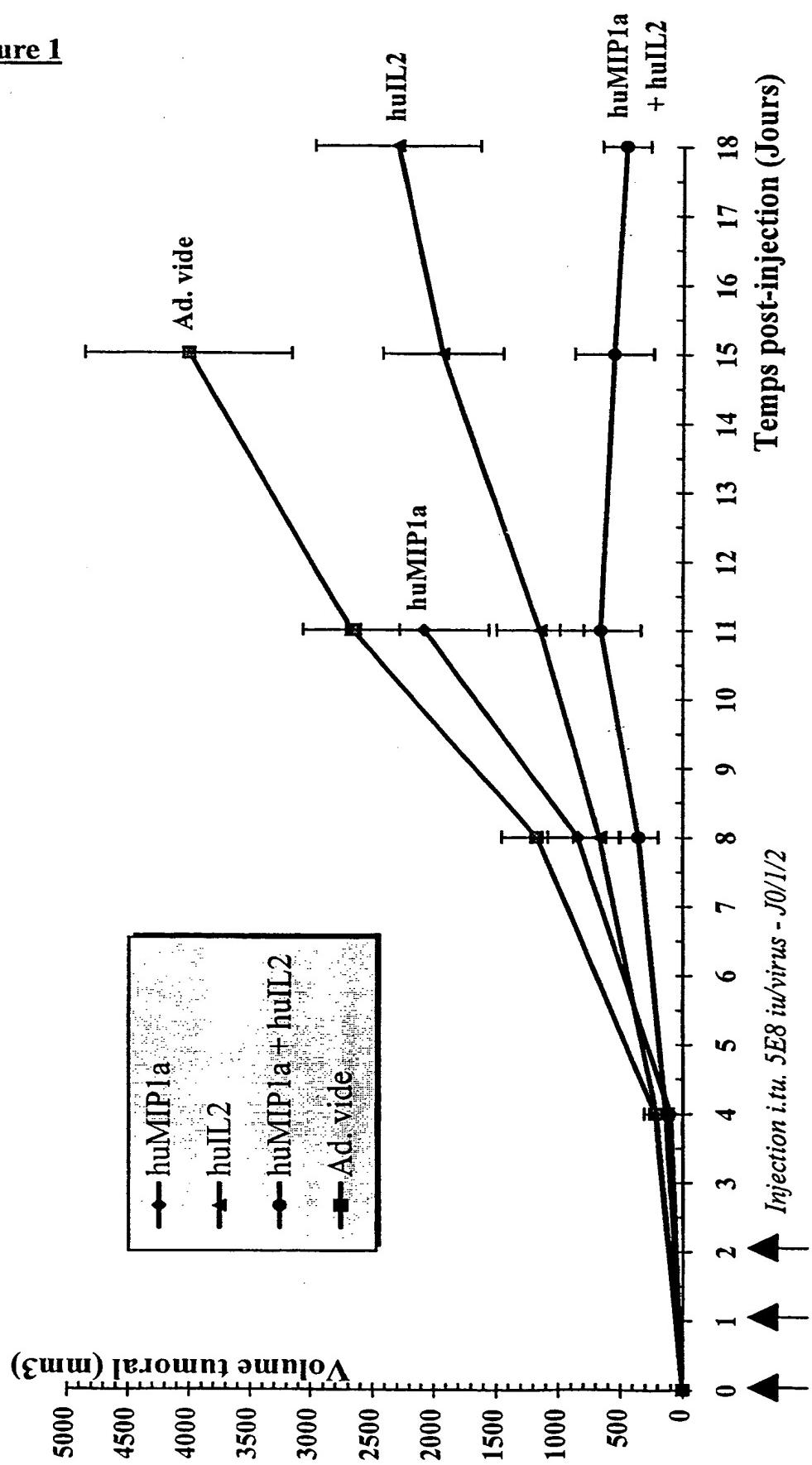
19. Formulation destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte une composition selon l'une des revendications 1 à 13, un vecteur selon les revendications 14 ou 15 , une particule virale selon la revendication 16, ou 25 une composition selon la revendication 18, ainsi qu'un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

20. Formulation selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle comporte des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une

prodrogue capable d'être transformée en molécule cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique.

21. Formulation selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite prodrogue est sélectionnée parmi la 5-fluorouracile (5-FU) et la 5-fluorocytosine ((5-FC)).

22. Utilisation d'une composition selon les revendications 1 à 13, d'un vecteur selon les revendications 14 à 15, d'une particule virale selon la revendication 16, ou d'une composition selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament cytotoxique.

Figure 1

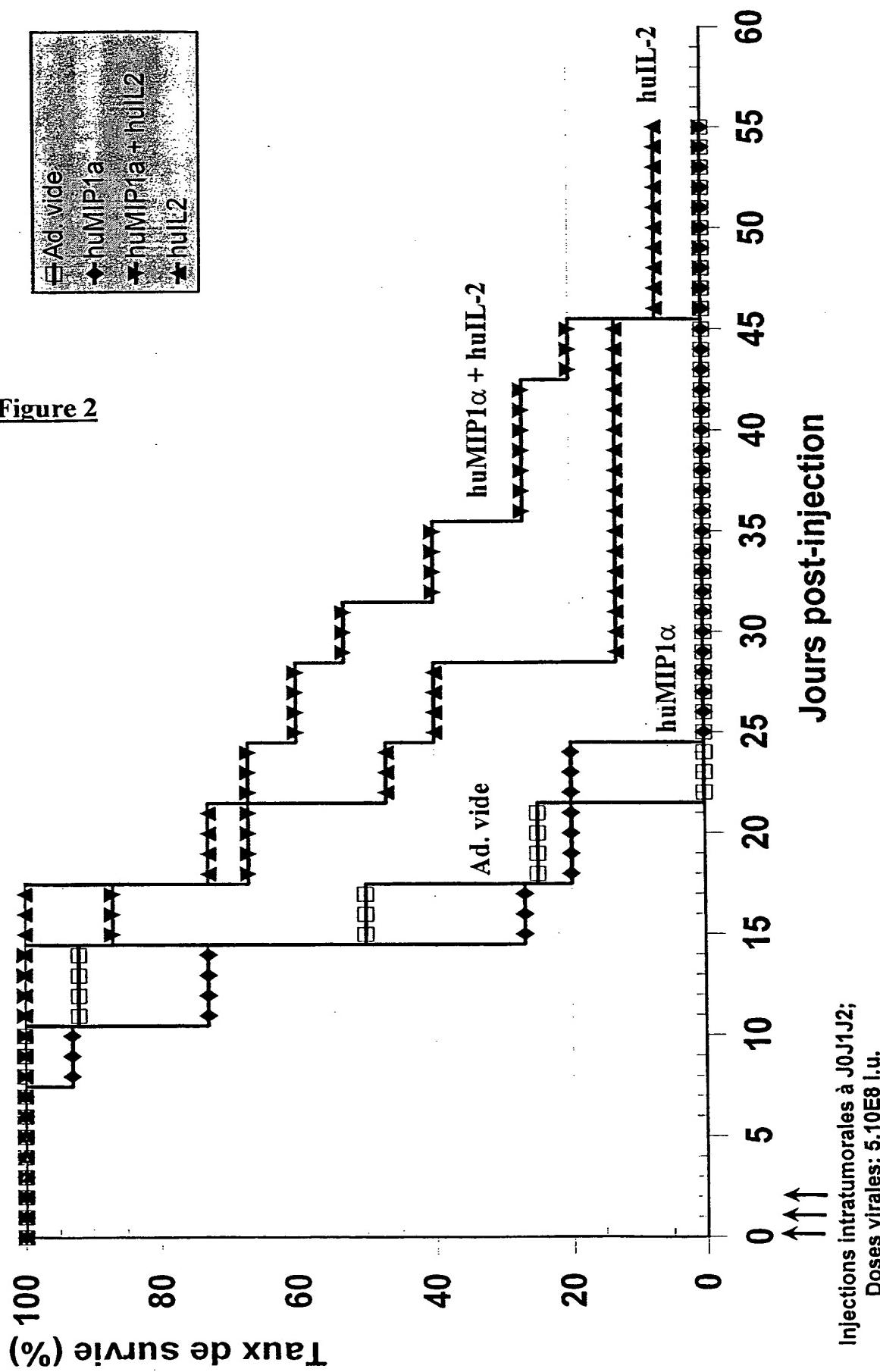
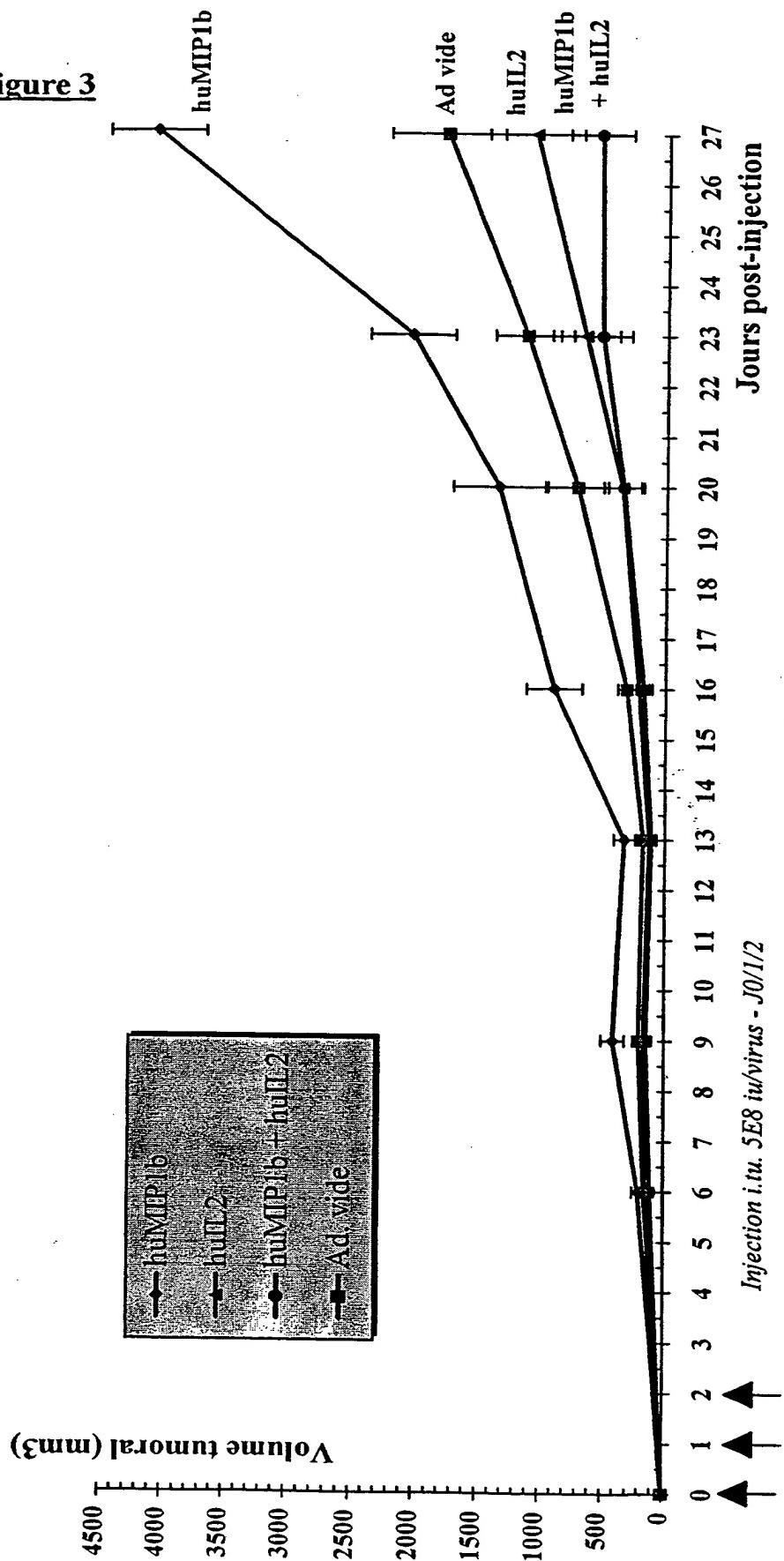


Figure 3

$0.0001 < p < 0.025$

Figure 4

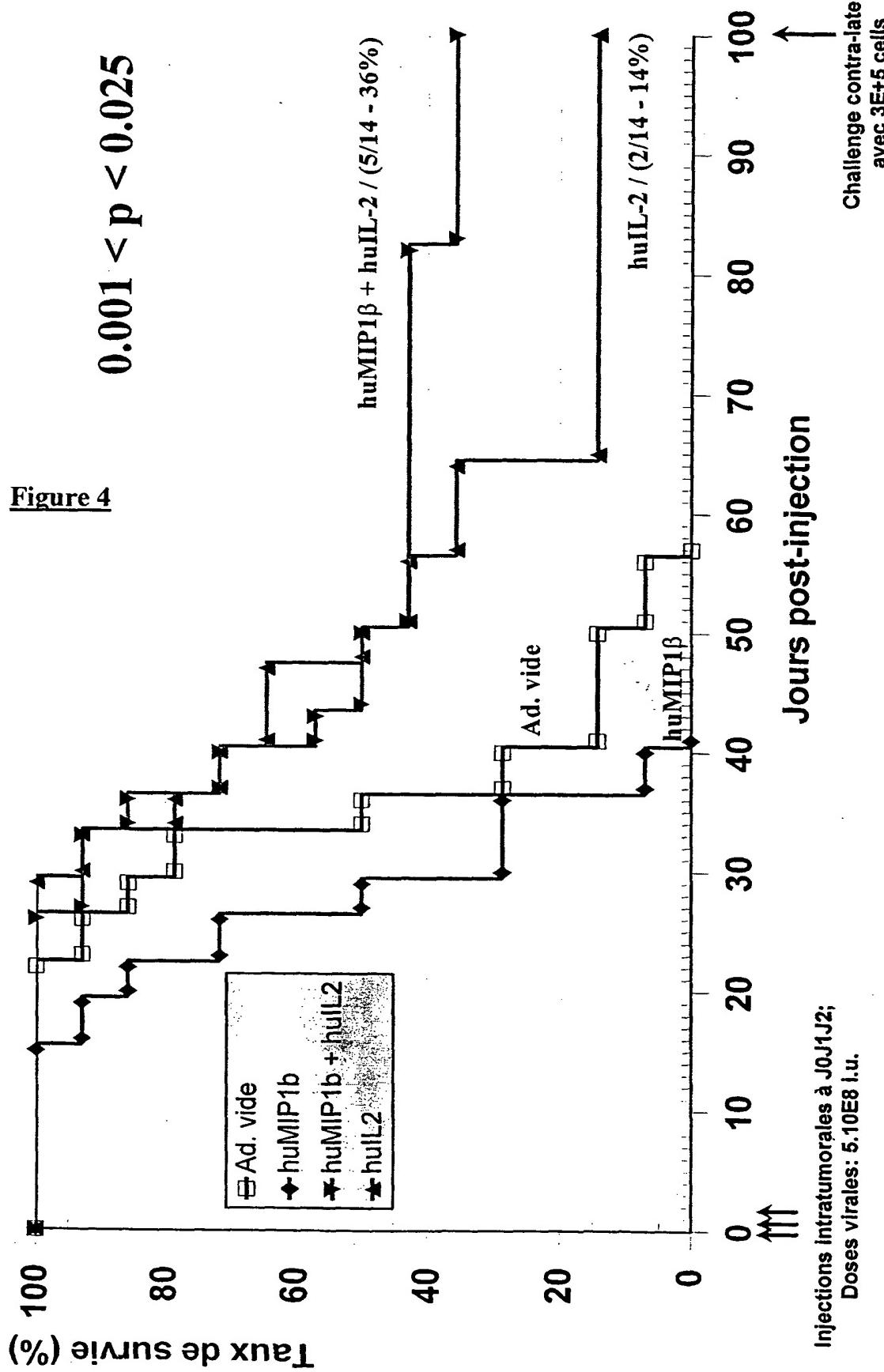


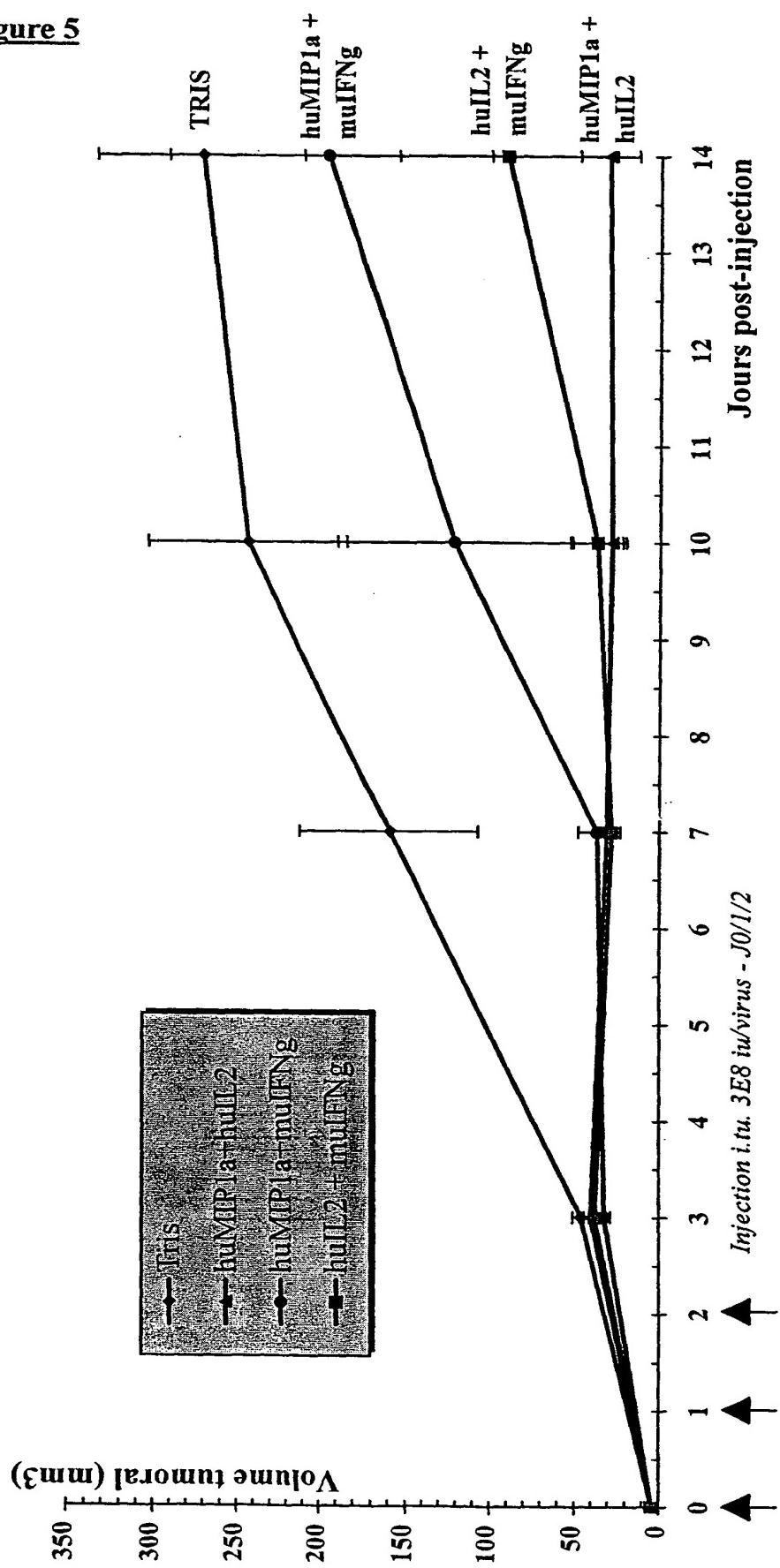
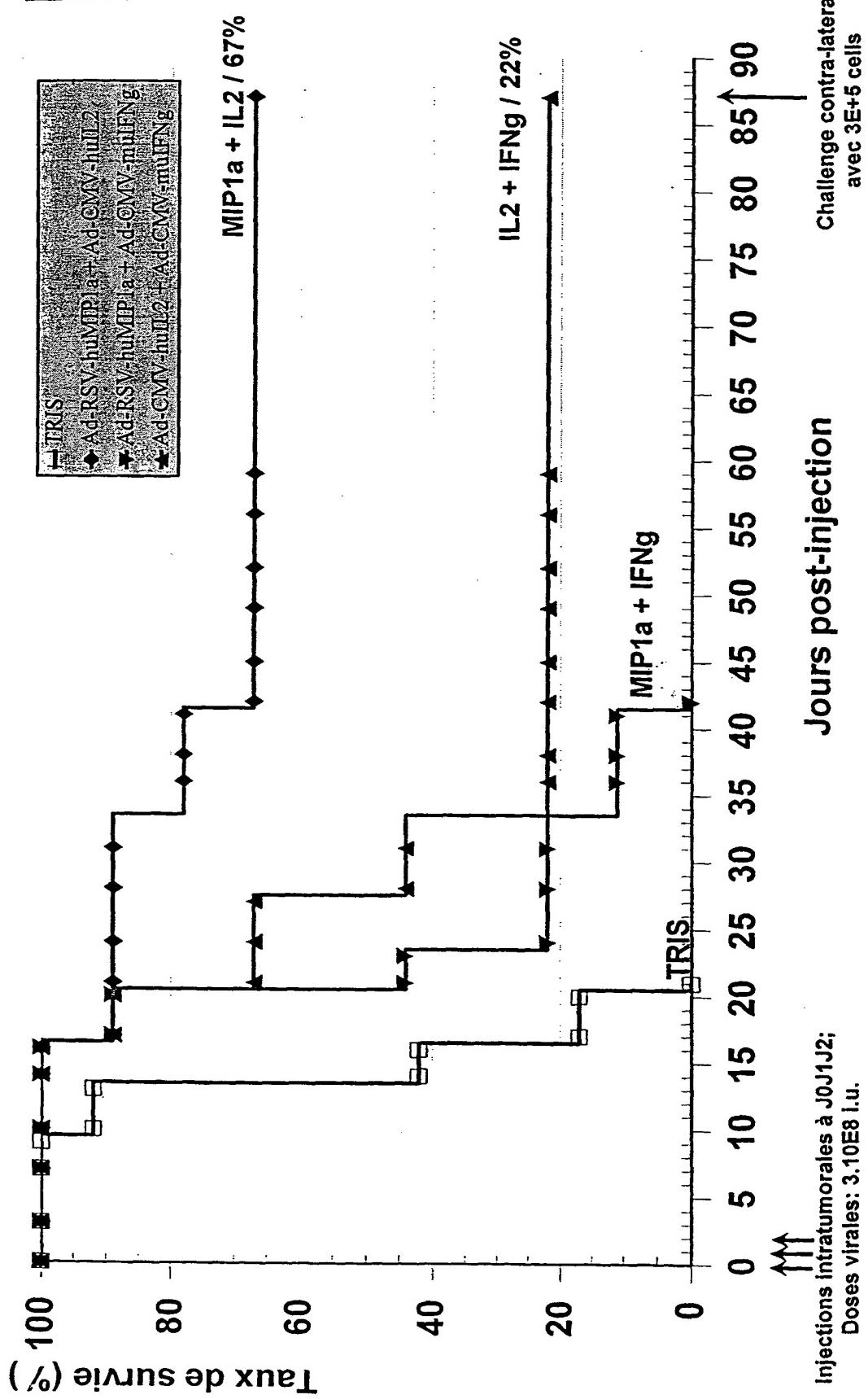
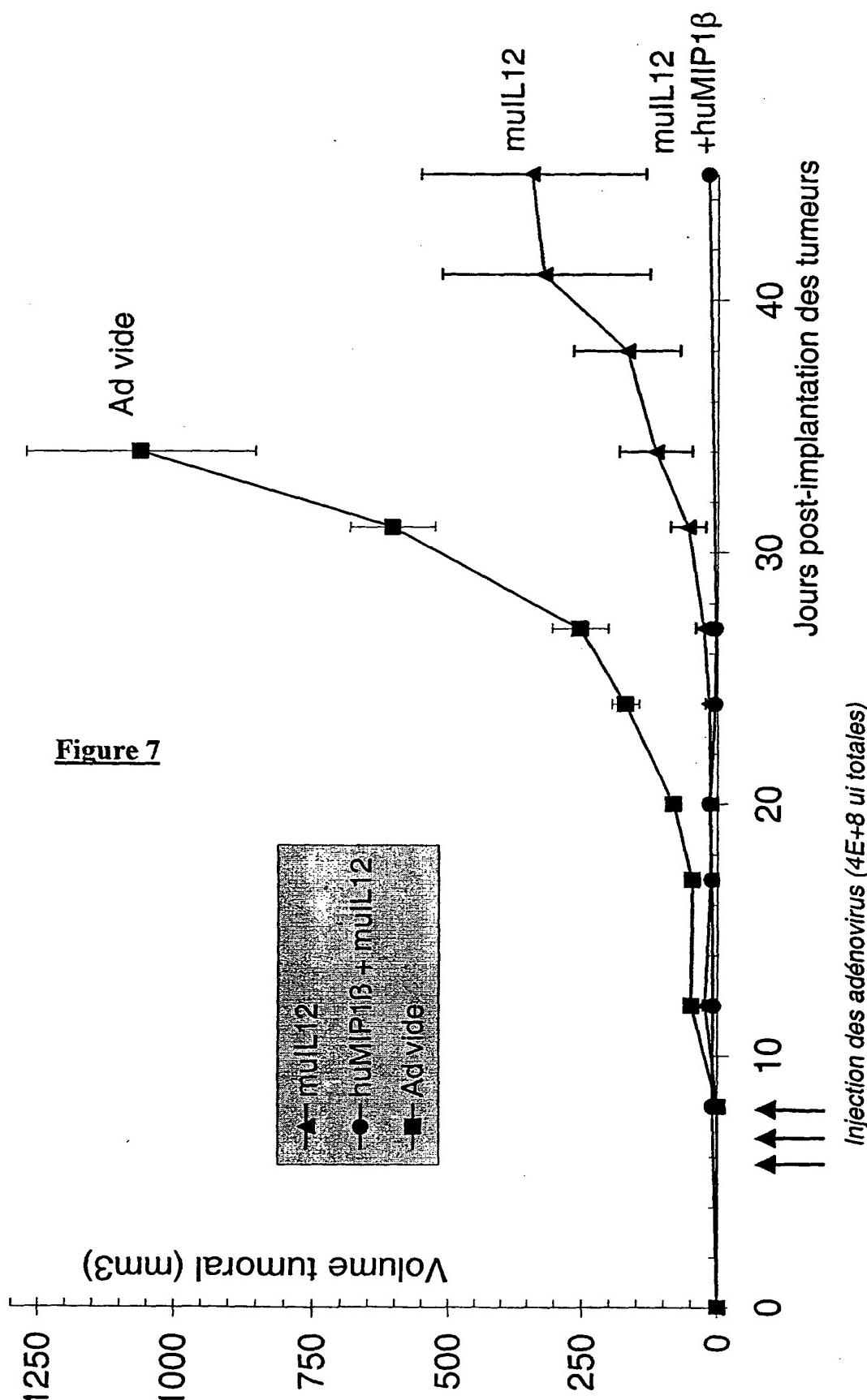
Figure 5

Figure 6





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/19 A61K48/00 A61K38/19 A61K38/20 A61K38/21
//(A61K38/20,A61K38:19),(A61K38/21,A61K38:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 94 13321 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 23 June 1994 (1994-06-23) page 6, line 2 - line 6 page 7, line 13 -page 8, line 9 page 30, line 19 -page 31, line 3 page 34, line 1 - line 34 page 35 -page 36; table 2 --- | 1-4, 10-19, 22 |
| X | WO 97 15595 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;PELUS LOUIS MARTIN (US); KING ANDREW GARR) 1 May 1997 (1997-05-01) page 2, line 13 - line 23 page 8, line 11 -page 13, line 20 --- | 1-4, 11-19, 22 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 2000

Date of mailing of the international search report

18/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/01559

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A | DILLOO ET AL: "COMBINED CHEMOKINE AND CYTOKINE GENE TRANSFER ENHANCES ANTITUMOR IMMUNITY" NATURE MEDICINE, vol. 2, 1996, pages 1090-1095, XP002133387 cited in the application page 1090 abstract ----- A DATABASE MEDLINE 'Online' US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; LU Y ET AL: "Macrophage inflammatory protein -1alpha (MIP -1alpha) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1." retrieved from STN Database accession no. 1999132267 XP002133388 abstract & CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (1999 FEB) 115 (2) 335-41., ----- | |
| | | |

INT'L NATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01559

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|----------|---|------------------|
| WO 9413321 | A 23-06-1994 | US | 6143289 | A | 07-11-2000 |
| | | AU | 5847794 | A | 04-07-1994 |
| | | EP | 0673256 | A | 27-09-1995 |
| WO 9715595 | A 01-05-1997 | AU | 712235 | B | 04-11-1999 |
| | | AU | 7520996 | A | 15-05-1997 |
| | | BR | 9611173 | A | 30-03-1999 |
| | | CZ | 9801202 | A | 16-09-1998 |
| | | EP | 0866806 | A | 30-09-1998 |
| | | HU | 9802531 | A | 01-02-1999 |
| | | JP | 11512747 | T | 02-11-1999 |
| | | NO | 981818 | A | 17-06-1998 |
| | | PL | 326364 | A | 14-09-1998 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem → Internationale No
PCT/FR 00/01559

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/19 A61K48/00 A61K38/19 A61K38/20 A61K38/21
//(A61K38/20, A61K38:19), (A61K38/21, A61K38:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | WO 94 13321 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 23 juin 1994 (1994-06-23) page 6, ligne 2 - ligne 6 page 7, ligne 13 -page 8, ligne 9 page 30, ligne 19 -page 31, ligne 3 page 34, ligne 1 - ligne 34 page 35 -page 36; tableau 2 --- | 1-4, 10-19,22 |
| X | WO 97 15595 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;PELUS LOUIS MARTIN (US); KING ANDREW GARR) 1 mai 1997 (1997-05-01) page 2, ligne 13 - ligne 23 page 8, ligne 11 -page 13, ligne 20 --- | 1-4, 11-19,22 |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 00/01559

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | DILLOO ET AL: "COMBINED CHEMOKINE AND CYTOKINE GENE TRANSFER ENHANCES ANTITUMOR IMMUNITY" NATURE MEDICINE, vol. 2, 1996, pages 1090-1095, XP002133387 cité dans la demande page 1090 abrégé ----- | |
| A | DATABASE MEDLINE 'en ligne' US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; LU Y ET AL: "Macrophage inflammatory protein -1alpha (MIP -1alpha) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1." retrieved from STN Database accession no. 1999132267 XP002133388 abrégé & CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (1999 FEB) 115 (2) 335-41., ----- | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dernier : Internationale N°

PCT/FR 00/01559

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | | Date de publication |
|---|------------------------|---|----|------------|------------------------|
| WO 9413321 | A | 23-06-1994 | US | 6143289 A | 07-11-2000 |
| | | | AU | 5847794 A | 04-07-1994 |
| | | | EP | 0673256 A | 27-09-1995 |
| WO 9715595 | A | 01-05-1997 | AU | 712235 B | 04-11-1999 |
| | | | AU | 7520996 A | 15-05-1997 |
| | | | BR | 9611173 A | 30-03-1999 |
| | | | CZ | 9801202 A | 16-09-1998 |
| | | | EP | 0866806 A | 30-09-1998 |
| | | | HU | 9802531 A | 01-02-1999 |
| | | | JP | 11512747 T | 02-11-1999 |
| | | | NO | 981818 A | 17-06-1998 |
| | | | PL | 326364 A | 14-09-1998 |